

An das
Deutsche Patentamt
80297 München

DEUTSCHES PATENTAMT

① **Bezeichnungen des Deutschen Patentamts sind zu richten an:**

In der
Anschriß
Straße,
Haus-Nr.
und ggf.
Postfach
angeben

Herrn Patentanwalt
Dr. Hans D. Boeters
Bereiteranger 15
81541 München

**Antrag
auf Erteilung eines Patents**

196 39 456.2

② **Zeichen des Anmelders/Vertreters (max. 20 Stellen)** 8299-GBF **Telefon des Anmelders/Vertreters** 089/85 00 85 **Datum** 25. Sept. 1996

③ **Der Empfänger in Feld ① ist der** ☐ Anmelder ☐ Zustellungsbevollmächtigter ☒ Vertreter **ggf. Nr. der Allgemeinen Vollmacht**

④ **Anmelder** Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) Mascheroder Weg 1 38124 Braunschweig

nur auszufüllen, wenn abweichend von Feld ①

Vertreter Dr. Hans D. Boeters
Dipl.-Ing. Robert Bauer
Dr. Enno Meyer
Bereiteranger 15
81541 München

⑤ **Anmeldercode-Nr.** **Vertretercode-Nr.** **Zustelladresse-Code-Nr.**

⑥ **Bezeichnung der Erfindung (bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach)**
Epothilon-Derivate, Herstellung und Mittel

⑦ **Sonstige Anträge** **Altzeichen der Hauptanmeldung (des Hauptpatents)**

☐ Die Anmeldung ist Zusatz zur Patentanmeldung (zum Patent) →
☐ Prüfungsantrag - Prüfung der Anmeldung (§ 44 Patentgesetz)
☐ Recherchenantrag - Ermittlung der öffentlichen Druckschriften ohne Prüfung (§ 43 Patentgesetz)
☐ Lieferung von Ablichtungen der ermittelten Druckschriften im ☐ Prüfungsverfahren ☐ Recherchungsverfahren
☐ Aussetzung des Erteilungsbeschlusses auf _____ Monate
(§ 49 Abs. 2 Patentgesetz) (Max. 15 Mon. ab Anmelde- oder Prioritätsdag)

⑧ **Erklärungen** **Altzeichen der Stammanmeldung**

☐ Teilung/Ausscheidung aus der Patentanmeldung →
☐ an Lizenzvergabe interessiert (unverbindlich)
☐ mit vorzeitiger Offenlegung und damit treuer Altzeichen nicht einverstanden (§ 31 Abs. 2 Nr. 1 Patentgesetz)

⑨ ☐ Inländische Priorität (Datum, Altzeichen der Voranmeldung)
☐ Ausländische Priorität (Datum, Land, Altzeichen der Voranmeldung) **bei Überlänge auf gesondertem Blatt - 2fach**

28

⑩ **Gebührenzahlung in Höhe von 100,00 DM** **Abbuchung von mehrzahligen Abbuchungsschritten b. d. Bundesbank München**

☒ Scheck ☐ Überweisung (nach Erhalt der Empfangsbescheinigung) ☐ Gebührenverfahren sind beigelegt (hilft nicht auf d. Rückseite Neben, ggf. auf gesond. Blatt) ☐ N:

⑪ **Anlagen**

1. 1 Vertretervollmacht ☒ Teletax vorab am 25.09.96
2. 1 Erfindungsbezeichnung
3. 1 Zusammenfassung (ggf. mit Zeichnung)
4. 20 Seite(n) Beschreibung
5. 6 ggf. Bezugszeichenliste
6. 11 Seite(n) Patentansprüche
7. 11 Anzahl Patentansprüche
8. 11 Blatt Zeichnungen
9. 11 Abdruck(en) d. Voranmeld.

⑫ **Unterschrift(en)**
162
(Dr. Boeters)

P 2007
8.93

PAK 02

Bestell-Nr. 02410 Nachdruck verboten
Carl Heymanns Verlag KG, Luxemburger Straße 449, 50939 Köln

BOETERS & BAUER

PATENTANWÄLTE
EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

BEREITERANGER 15
D-81541 MÜNCHEN

PA. BOETERS & BAUER
BEREITERANGER 15, D-81541 MÜNCHEN

DIPLOM.-CHEM. DR. HANS D. BOETERS
DIPLOM.-ING. ROBERT BAUER
PHYS. DR. ENNO MEYER

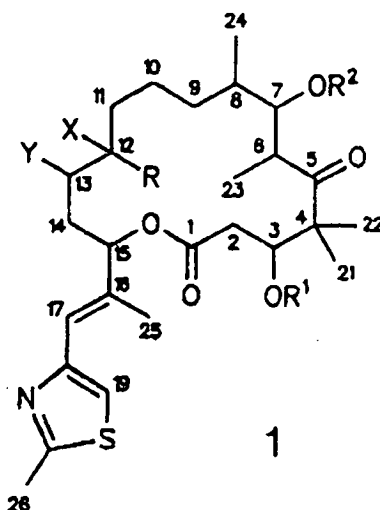
TELEFON: (089) 85 00 88
TELEFAX: (089) 85 39 82
TELEGRAMME: PROVENTION, MÜNCHEN

25. September 1996/he

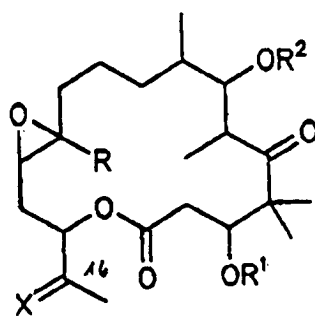
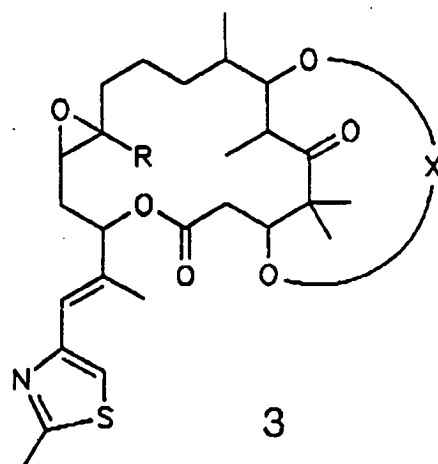
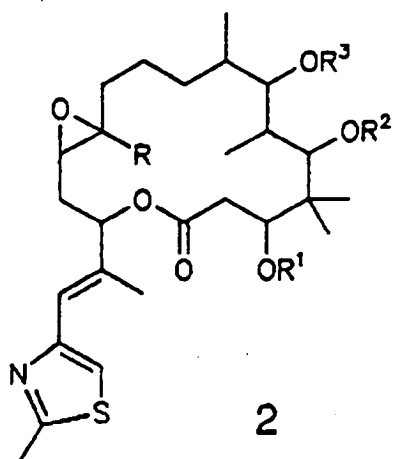
Unser Zeichen: 8299-GBF

Epothilonderivate, Herstellung und Mittel

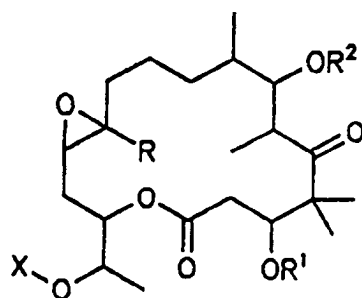
Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonderivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonderivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.



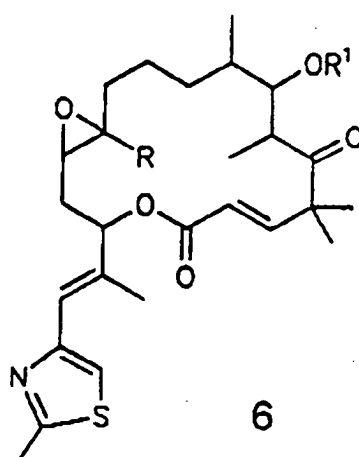
- 2 -



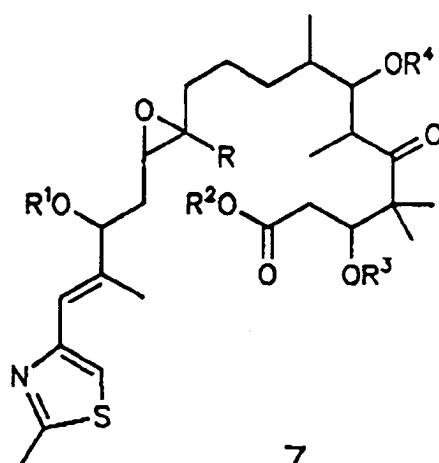
4



5



6



7

In den vorstehenden Formeln 1 bis Formel 7 bedeuten:

R = H, C₁₋₄-Alkyl;
 R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁₋₆-Alkyl,
 C₁₋₆-Acyl-Benzoyl,
 C₁₋₄-Trialkylsilyl,
 Benzyl,
 Phenyl,
 C₁₋₆-Alkoxy-,
 C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-
 substituiertes Benzyl bzw. Phenyl;

wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

In der Formel 1 sind X und Y entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Halogen, OH, O-(C₁₋₆)-Acyl, O-(C₁₋₆)-Alkyl, O-Benzoyl.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂-, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Für Epothilon A und B sei verwiesen auf DE-A-41 38 042.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu

Hydrogenwasserstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wässrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine $X = \text{Hal}$, $Y = \text{OH}$ und $Y = \text{OH}$, $Y = \text{Hal}$ erhält. Protonensäuren wie z.B. Toluolsulfonsäure und Trifluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z.B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH_3/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z.B. mit NaBH_4 in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionellen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflats ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z.B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z.B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fachmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrazone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinierung in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z.B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z.B. bei O-Formyl durch NH_3/MeOH , bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z.B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z.B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z.B. mit NaOH in MeOH oder MeOH/Wasser. Vorzugsweise werden Verbindungen der allgemeinen Formel 7 aus Epothilon A oder B oder deren 3-OH- oder 7-OH-geschützten Derivaten durch enzymatische Hydrolyse erhalten, insbesondere mit Esterasen oder Lipasen. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Ferner können Verbindungen der Formel 7 durch Lactonisierung nach den Methoden von Yamaguchi (Trichlorbenzoylchlorid/DMAP), Corey (Aldrithiol/Triphenylphosphin) oder Kellogg (omega-Bromsäure/Caesiumcarbonat) in Verbindung der Formel 2 umgewandelt werden. Einschlägige Arbeitsmethoden finden sich bei

Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989;
Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; und
Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

- 7 -

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilonderivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken, so daß sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

Beispiele

Beispiel 1:

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 µl (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

- 8 -

Ausbeute: 4 mg (19 %) Isomer I
4 mg (19 %) Isomer II

Isomer I

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734
(vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256
(s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch),
884 (w), 735 (w) cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32),
206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100),
113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: C₂₆H₃₉O₆NS ber.: 493.2498 für [M-H₂O]⁺
gef.: 493.2478

Isomer II

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.22

IR (Film): ny = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727
(vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265
(s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm⁻¹.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H₂O]⁺), 394 (12), 306 (46),
206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100),
113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

Hochauflösung: C₂₆H₃₉O₆NS ber.: 493.2498 für [M-H₂O]⁺
gef.: 493.2475

Beispiel 2:**Verbindung 1b**

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10). Ausbeute: 19 mg (32 %)

R_F (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46

IR (Film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: C₂₆H₄₀O₆ClNS ber.: 529.2265 für [M⁺],
gef.: 529.2280

Beispiel 3:**Verbindung 1c**

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 µl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 µl (0.517

- 10 -

mmol) 98 %-iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15°C werden dem Reaktionsgemisch $40\ \mu\text{l}$ ($0.423\ \text{mmol}$) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15°C gerührt. Nachdem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt, werden dem Reaktionsgemisch weitere $6\ \text{mg}$ ($0.047\ \text{mmol}$) Dimethylaminopyridin, $7\ \mu\text{l}$ ($0.047\ \text{mmol}$) Triethylamin, $2\ \mu\text{l}$ 98 %-ige Ameisensäure ($0.047\ \text{mmol}$) und $4\ \mu\text{l}$ ($0.047\ \text{mmol}$) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit $1\ \text{M}$ Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10). Ausbeute: $5\ \text{mg}$ (18 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton. 90 : 10): 0.67

IR (Film): ν_{max} = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 613 (9 [M^+]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

Hochauflösung: $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{NSCl}$ ber.: 613.2112 für [M^+]
gef.: 613.2131

- 11 -

Beispiel 4:**Verbindung 1d**

10 mg (0.020 mmol) Epothilon B werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C₂₇H₄₂O₆NSCl ber.: 543.2421 für [M⁺]
gef.: 543.2405

Beispiel 5:**Verbindung 2a**

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natriumborhydrid (150 mg = 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschichtchromatogramm vollständig abreagiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie

- 12 -

(Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 - grad - nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 75 : 25): 0.27

IR (Film): ν = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{NS}$ ber.: 495.2655 für [M⁺]
gef.: 495.2623

Beispiel 6:

Verbindung 3a-d (a-d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 μl (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a-d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

- 13 -

Verbindung 3a**Ausbeute:** 4 mg (12 %)**R_f** (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.50

IR (Film): ny = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs),
1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s,
Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957
(s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch)
cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316
(27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151
(43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]

Verbindung 3b**Ausbeute:** 14 mg (13 %)**R_f** (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.44

IR (Film): ny = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s),
1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m,
Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076
(w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch),
806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

- 14 -

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.38

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1 %)

R_f (Toluol/Methanol, 90 : 10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₇NS₂ ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1997

- 15 -

Beispiel 7:**Verbindung 4a**

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70 °C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch präparative Schichtchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.

Ausbeute: 5 mg (64 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5): 0.61

IR (Film): ν = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

Hochauflösung: C₂₁H₃₄O₇ ber.: 398.2305 für [M⁺]
gef.: 398.2295

Beispiel 8:**Verbindung 6a**

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 27 μ l (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

- 16 -

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdi-hydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ny = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch),
1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch),
1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s,
Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm⁻¹

UV (Methanol): lambda_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318
(40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151
(29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: C₂₆H₃₇O₅NS ber.: 475.2392 für [M⁺]
gef. 475.2384

Beispiel 9:

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90 °C gerührt.

- 17 -

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute: 7 mg (15 %)

Substanzcode

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.62

IR (Film): ny = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

Hochauflösung: C₂₇H₃₇O₆NS ber.: 503.2342 für [M⁺]
gef.: 503.2303

- 18 -

Beispiel 10:**Verbindung 6c**

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50 °C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67 %)

R_f (Dichlormethan/Aceton, 90 : 10): 0.55

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: C₂₈H₃₉O₆NS ber.: 517.2498 für [M⁺]
gef.: 517 2492

Beispiel 11:**Verbindung 7a**

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat

- 19 -

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 85 : 15): 0.92

IR (Film): ny = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch),
1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383
(m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch),
1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s)
cm⁻¹

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140
(100), 85 (31), 57 (67).

Hochauflösung: C₂₃H₃₇O₄NS ber.: 423.2443 für [M⁺]
gef.: 423.2410

Beispiel 12:
Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 µl einer ammoniakalischen Methanollösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50 °C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59 %)

R_f (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.63

- 20 -

IR (Film): ν = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 567 (1 [M^+]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{NS}$ ber.: 567.2866 für [M^+]
gef.: 567.2849

Beispiel 13:

50 mg Epothilon A werden in 20 μl Dimethylsulfoxid angelöst und mit 30 ml Phosphatpuffer (pH 7,1, 30 mM) verdünnt. Nach Zugabe von 5 mg Schweineleberesterase (Fa. Boehringer Mannheim) wird 2 Tage bei 30 °C gerührt. Man säuert mit 2 N HCl auf pH 5 an und extrahiert die Epothilonsäure 7 mit Ethylacetat. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Ausbeute 48 mg (96 %).

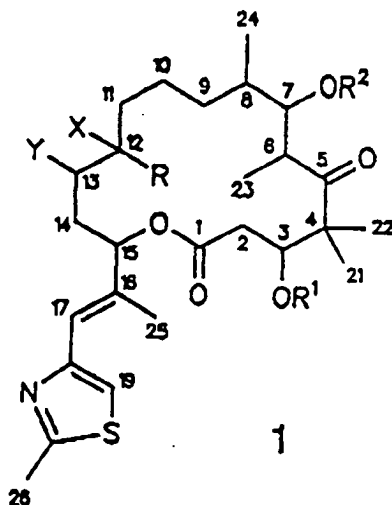
Beispiel 14:

48 mg Epothilonsäure 7 werden in 6 ml THF abs. gelöst und unter Rühren mit 40 μl Triethylamin und 16 μl 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid versetzt. Nach 15 min wird vom Niederschlag abfiltriert und innerhalb von 15 min unter schnellem Rühren in eine siedende Lösung von 20 mg 4-Dimethylaminopyridin in 200 ml Toluol abs. getropft. Nach weiteren 10 min wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand zwischen Ethylacetat/Citratpuffer (pH 4) verteilt. Der Eindampfrückstand der organischen Phase ergibt nach präparativer HPLC Trennung 15 mg Epothilon A.

25. September 1996/he

Patentansprüche

1. Epothilonderivat der Formel 1

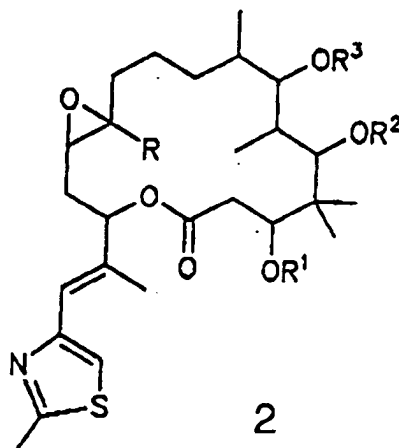


wobei $R = H, C_1-4\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_1-6\text{-Alkyl}, C_1-6\text{-Acyl},$
 Benzoyl, $C_1-4\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_1-6\text{-Alkoxy-}, C_6\text{-}$
 Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
 und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-
 gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X und
 Y entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Halogen,
 OH, O-(C_1-6)-Acyl, O-(C_1-6)-Alkyl, O-Benzoyl stehen.

0-1 Anlagen
 FA - ER

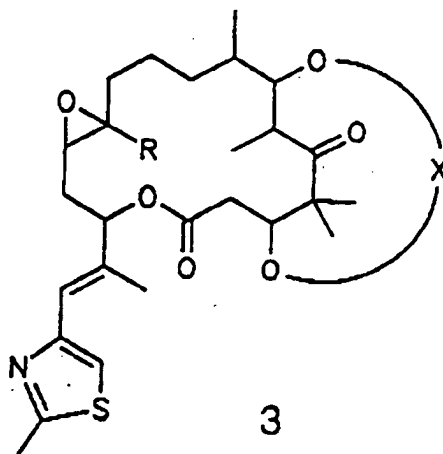
- 2 -

2. Epothilonderivat der Formel 2



wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R², R³ = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

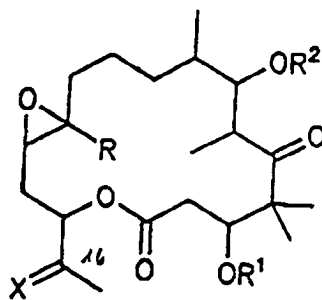
3. Epothilonderivat der Formel 3



- 3 -

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl}, C_{1-6}\text{-Acyl},$
 Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl;
 und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acyl-
 gruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X all-
 gemein für $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-S(O)-$, $-CR^1R^2-$ und $-SiR^2-$ steht, wo-
 bei R, R^1 und R^2 die Bedeutung haben wie oben angegeben und R^1
 und R^2 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6 Kohlenstoff-
 atomen bilden können.

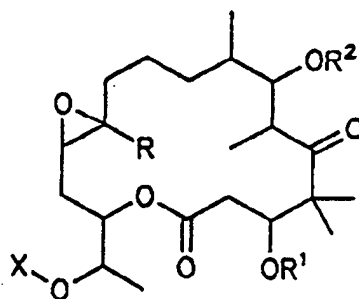
4. Epothilonderivat der Formel 4



4

wobei $R = H, C_{1-4}\text{-Alkyl}$; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}\text{-Alkyl},$
 $C_{1-6}\text{-Acyl}$, Benzoyl, $C_{1-4}\text{-Trialkylsilyl}$, Benzyl, Phenyl, $C_{1-6}\text{-Alkoxy-}$, $C_6\text{-Alkyl-}$, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl
 bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen
 Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste
 handelt, X Sauerstoff, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, und $N-NHCONR^4R^5$ bedeutet,
 wobei die Reste R^3 bis R^5 die oben angegebene Bedeutung haben
 und R^4 und R^5 auch zusammen eine Alkylengruppe mit 2 bis 6
 Kohlenstoffatomen bilden können.

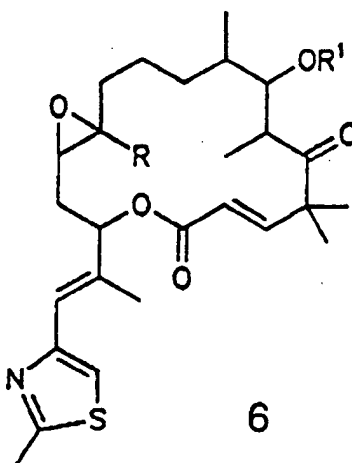
5. Epothilonderivat der Formel 5



5

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C₁₋₁₈-Alkyl, C₁₋₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet.

6. Epothilonderivat der Formel 6



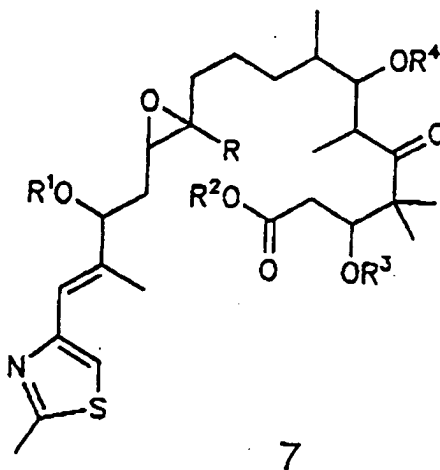
6

wobei R = H, C₁₋₄-Alkyl und R¹ = H, C₁₋₆-Alkyl, C₁₋₆-Acyl, Benzoyl, C₁₋₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁₋₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl

- 5 -

ist, und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

7. Epothilonderivat der Formel 7



wobei $R = H$, C_{1-4} -Alkyl und R^1 , R^2 , R^3 , $R^4 = H$, C_{1-6} -Alkyl, C_{1-6} -Acyl, Benzoyl, C_{1-4} -Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C_{1-6} -Alkoxy-, C_6 -Alkyl-, Hydroxy- und halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

8. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 7 gemäß Anspruch 7, dadurch **gekennzeichnet**, daß man Epothilon A, Epothilon B, ein 3-OH-geschütztes Derivat derselben oder ein 7-OH-geschütztes Derivat derselben

(a) enzymatisch hydrolysiert, insbesondere mit einer Esterase oder Lipase, oder

(b) in alkalischem Medium hydrolysiert, insbesondere mit Natriumhydroxid in einem Methanol/Wasser-Gemisch, und das Epothilonderivat der Formel 7 gewinnt und isoliert.

9. Verfahren zur Herstellung eines Epothilonderivats der Formel 2 gemäß Anspruch 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß man ein

Epothilonderivat der Formel 7 gemäß Anspruch 7 oder als Produkt des Verfahrens gemäß Anspruch 8

(a) nach der Yamaguchi-Methode oder

(b) nach der Corey-Methode oder

(c) nach der Kellogg-Methode

in das Epothilonderivat der Formel 2 umwandelt und dieses Umwandlungsprodukt isoliert.

10. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

11. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonderivate und deren Verwendung.

To the
German Patent Office
80297 Munich

GERMAN PATENT OFFICE

In the address, give street, house number and, if applicable, P.O. box number	(1) Shipments of the German Patent Office are to be directed to: To: Dr. Hans D. Boeters Patent Attorney Bereiteranger 15 81541 Munich		Application for granting a patent
			File No. (issued by the German Patent Office) 196 39 456.2
	(2) Reference of the Applicant/ Representative (max. 20 digits) 8299-GBF	Telephone No. of the Applicant/ Representative 089/65 00 86	Date Sept. 25, 1996
	(3) The recipient in field (1) is the <input type="checkbox"/> Applicant <input type="checkbox"/> Power of Attorney <input checked="" type="checkbox"/> Representative If applicable, No. of general power of attorney		
Fill out only when different from field (1)	(4) Applicant Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) Mascheroder Weg 1 38124 Braunschweig		Representative Dr. Hans D. Boeters Dipl.-Ing. Robert Bauer Dr. Enno Meyer Bereiteranger 15 81541 Munich
If known	(5) Application code No.	Representative code No.	Delivery address code No.
	(6) Description of the invention (if too long, submit on a separate sheet in 3 copies) Epothilone Derivatives, Preparation and Means		
see explanations and cost information on the reverse side	(7) Other applications <input type="checkbox"/> The application is an addition to Patent Application (to the patent) → <input type="checkbox"/> Application for examination - examination of the application (§ 44 Patent Law) <input type="checkbox"/> Application for search - determination of published documents without examination (§ 43 of the Patent Law) Supply of copies of the determined publications in: <input type="checkbox"/> Examination process <input type="checkbox"/> Research process <input type="checkbox"/> Deferment of the decision of granting to _____ months (§ 49 of Section 2 of the Patent Law) (Maximum 15 months from the date of application or priority)		File No. of the main Application (of the main Patent)
	(8) Explanations <input type="checkbox"/> Division/exclusion from the Patent Application → <input type="checkbox"/> Interested in granting licenses (without obligation) <input type="checkbox"/> With prior laying open and thus agreement with free inspection of the documents (§ 31, Section 2, No. 1 of the Patent Law)		File No. of the initial Application
	(9) <input checked="" type="checkbox"/> Domestic priority (date, file number of the prior application) } <input type="checkbox"/> Foreign priority (date, country, file number of the prior application) }		(in case of excessive length, submit on a separate sheet in two copies) 28 (rest is illegible)
Explanation and cost information on the reverse side	(10) Payment of fees in the amount of <u>100.00</u> DM <input checked="" type="checkbox"/> Check is attached <input type="checkbox"/> Transfer (after receipt of advice of receipt) <input type="checkbox"/> Receipt stamps are attached (please do not glue on the reverse side, possibly on a separate sheet) <input type="checkbox"/> charge to my/our account at Dresdner Bank AG, Munich No.:		

- (11) Attachments
- Attachments 3-7, each 3 copies
1. — Power of Attorney
 2. 1 naming the inventor
 3. 1 summary (optionally with drawings fig. —)
 4. 20 pages of specifications
 5. — optional reference number list
 6. 6 pages of Patent Claims
 7. 11 number of Patent Claims
 8. — pages of drawings
 9. — copy(ies) of prior application

☒ Telefax sent previously on 09/25/96

(Dr. Boeters)
(12) Signature(s)

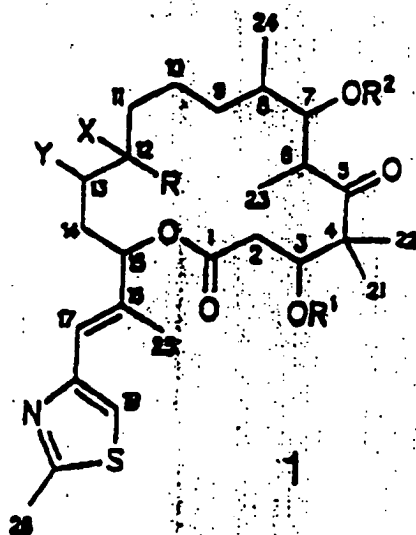
[BOETERS & BAUER, Patent Attorneys', Letterhead]

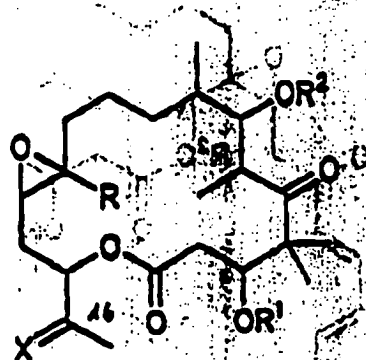
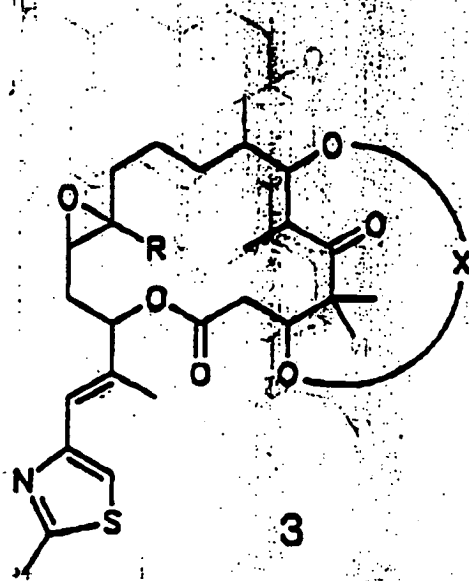
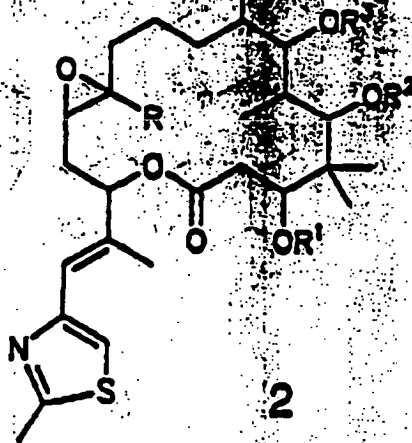
September 25, 1996/he

Our Reference: 8299-GBF

EPOTHILONE DERIVATIVES, PREPARATION AND MEANS

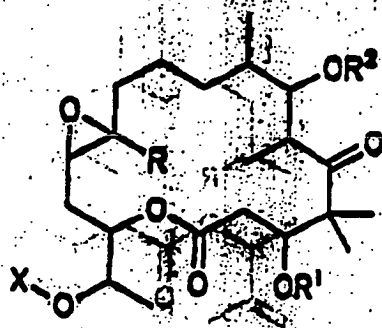
The present invention concerns general epothilone derivatives and their use for the production of drugs. Especially, the present invention is concerned with the preparation of epothilone derivatives according to the general Formulas 1 to 7 given below, as well as with their use for the production of therapeutic agents and agents for plant protection.



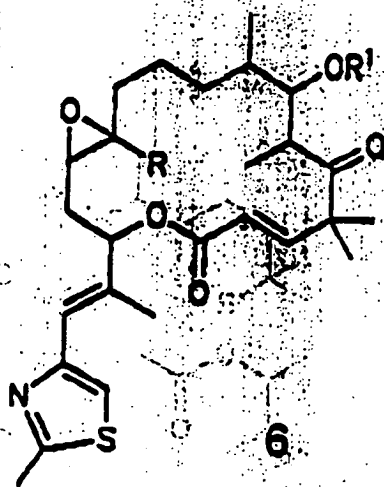


4

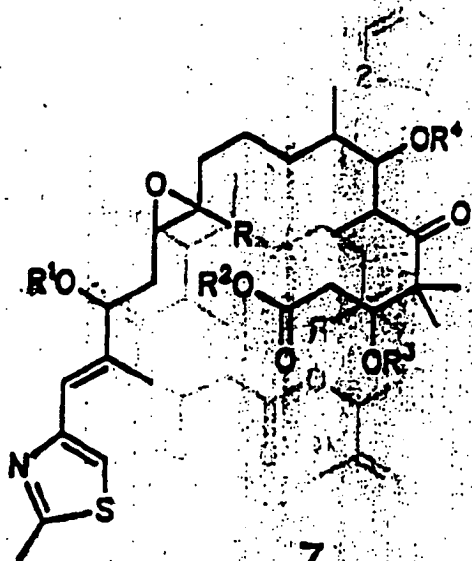
3



5



6



7

4

In the above Formulas 1 to 7, the symbols have the following meanings:

$R = H, C_{1-4}$ -alkyl;

$R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}$ -alkyl,

C_{1-6} -acyl-benzoyl,

C_{1-4} -trialkylsilyl,

benzyl,

phenyl,

C_{1-6} -alkoxy-,

C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl;

also, two of the groups R^1 to R^5 may be combined to form the grouping $-(CH_2)_n-$ with $n = 1$ to 6 and the alkyl or acyl groups contained in the groups are either straight-chain or branched groups;

In Formula 1, X and Y are either identical or different and can stand for halogen, OH, O- (C_{1-6}) -acyl, O- (C_{1-6}) -alkyl, O-benzoyl.

In Formula 3, X generally stands for $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-S(O)-$, $-CR^1R^2-$, where R^1 and R^2 have the meaning given above and $-SiR_2-$, where R has the meaning given above.

In Formula 4, X stands for oxygen, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, and $N-NHCONR^4R^5$, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above.

In Formula 5, X stands for hydrogen, C_{1-18} -alkyl, C_{1-18} -acyl, benzyl, benzoyl and cinnamoyl.

With regard to epothilone A and B, let us refer to DE-A-41 38 042. Compounds according to general Formula 1 are accessible starting from epothilone A and B, as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by opening the 12,13-epoxide. When hydrogen halides are used for this purpose in a preferred nonaqueous solvent, the halohydrins $X = Hal$, $Y = OH$ and $Y = OH$, $Y = Hal$ are obtained. Protonic acids, for example, toluenesulfonic acid and trifluoroacetic acid, lead to 12,13-diols in the presence of water and then these are acylated subsequently according to standard methods (for example, with carboxylic acid

anhydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or are alkylated (alkyl halides and silver oxide). For this purpose, the 3- and 7-hydroxy groups can be protected temporarily as the formate (cleaved with NH_3/MeOH) or p-methoxybenzyl ether (cleaved with DDQ).

Compounds according to general Formula 2 are obtainable from epothilone A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by reduction, for example, with NaBH_4 in methanol. If the 3-OH and/or 7-OH groups are protected reversibly during this process, after acylation or alkylation, and removal of the protecting groups, 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivatives according to general Formula 2 can be obtained.

Reactions of epothilone A and B with bifunctional electrophilic reagents, such as (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazole [sic], thionyl chloride or dialkylsilyl dichlorides or -bis-triflates give compounds having general Formula 3. The bases used as aids here can be pyridine, trialkylamine, optionally together with DMAP or 2,6-lutidine in an aprotic solvent. The 3,7-acetals having general Formula 3 are formed by transacetalization, for example, of dimethylacetals, in the presence of an acidic catalyst.

Compounds according to general Formula 4, are obtained from epothilone A and B or from their 3-O- and/or 7-O-protected derivatives by ozonolysis and reductive processing, for example, with dimethyl sulfide. The C-16 ketones can then be converted to the oximes, hydrazones or semicarbazones according to standard methods known to the expert in the field. Furthermore, they are converted to C-16/C-17 olefins by the Wittig, Wittig-Horner, Julia or Petersen olefination method.

The 16-hydroxy derivatives according to general Formula 5 are obtainable by reduction of the C-16 keto group, for example, with aluminum hydride or borohydride. When the 3-OH and 7-OH groups are protected correspondingly, they can be acylated or alkylated selectively. The liberation of the 3-OH- and 7-OH groups is done, for example, with NH_3/MeOH in the case of O-formyl and with DDQ in the case of O-p-methoxybenzyl.

The compounds having general Formula 6 are obtained from derivatives of epothilone A and B in which the 7-OH group is protected by acyl or ether groups, in which the 3-OH group

is, for example, formylated, mesylated or tosylated and then eliminated by treatment with a base, for example, DBU. The 7-OH group can be liberated as described above.

Compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A and B or from their 3-OH- and 7-OH-protected derivatives by basic hydrolysis, for example, with NaOH in MeOH or MeOH/water. Preferably, the compounds having general Formula 7 are obtained from epothilone A or B or from their 3-OH- or 7-OH-protected derivatives by enzymatic hydrolysis, preferably with esterases or lipases. The carboxyl group can be converted into the ester by alkylation with diazoalkanes after protection of the 19-OH group.

Furthermore, compounds having Formula 7 can be converted into the compound having Formula 2 by lactonization according to the methods of Yamaguchi (trichlorobenzoyl chloride/DMAP), Corey (aldrithiol/triphenylphosphine) or Kellogg (omega-bromic acid/cesium carbonate). The corresponding methods can be found in Inanaga et al. in Bull. Chem. Soc. Japan, 52 (1979) 1989; Corey & Nicolaou in J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5614; and Kruizinga & Kellogg in J. Am. Chem. Soc., 103 (1981) 5183.

Furthermore, the invention is concerned with means for plant protection in agriculture, forestry and/or gardening, consisting of one or several of the epothilone derivatives described above or consisting of one or several of the epothilone derivatives described above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Finally, the invention is concerned with therapeutic agents, consisting of one or several of the compounds listed above or of one or several of the compounds listed above in addition to one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s). These agents can exhibit especially cytotoxic activities and/or cause immunosuppression so that they can especially preferably be used as cytostatic agents.

The invention is explained further and described by the description of a few selected practical examples.

Examples

Translator's note: In the infrared spectra in the examples, the general English abbreviations are used, s, m, w, vs, b, etc., except for Sch = shoulder and ny = ν (nu). Also, the abbreviation lg stands for log.

Example 1:

Compound 1a

20 mg (0.041 mmole) of epothilone A is dissolved in 1 mL of acetone, with 50 μ L (0.649 mmole) of trifluoroacetic acid is added and the mixture is stirred overnight at 50°C. For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M pH 7 phosphate buffer and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer-chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) isomer I

4 mg (19%) isomer II

Isomer I

R_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film) ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (+) = 493 (43) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 396 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{NS}$

calculated: 493.2498 for $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$

found: 493.2478

Isomer IIR_f (dichloromethane/acetone, 85:15): 0.22

IR (Film): ν = 3484 (s, br, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 493 (21 [M-H₂O]⁺), 394 (12), 306 (46), 206 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: C₂₆H₃₉O₆NScalculated: 493.2498 for [M-H₂O]⁺

found: 493.2475

Example 2:**Compound 1b**

Epothilone A, 55 mg (0.111 mmole), is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, 0.5[sic] mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture is stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 N phosphate buffer of pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/methanol, 90:10). Yield: 19 mg (32%).

R_f (dichloromethane/methanol, 90:10): 0.46

IR (Film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 343 (38), 306 (23), 194 (32), 166 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: C₂₆H₄₀O₆CINS calculated: 529.2265 for [M⁺],
found: 529.2280

Example 3:

Compound 1c

12-Chloro-13-hydroxy-epothilone A (1b), 25 mg (0.047 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, and then 29 mg (0.235 mmole) of dimethylaminopyridine, 151 μ L (1.081 mmole) of triethylamine and 20 μ L (0.517 mmole) of 98% formic acid are added. The reaction mixture is cooled with ice/sodium chloride. After reaching -15°C , 40 μ L (0.423 mmole) of acetic anhydride is added to the reaction mixture, followed by stirring for 70 minutes at -15°C . Since the thin-layer chromatogram did not show complete conversion, another 6 mg (0.047 mmole) of dimethylaminopyridine, 7 μ L (0.047 mmole) of triethylamine, 2 μ L of 98% formic acid (0.047 mmole) and 4 μ L (0.047 mmole) of acetic anhydride are added to the reaction mixture, followed by stirring for 60 minutes. For work-up, the reaction mixture is heated to room temperature, 1 M phosphate buffer with pH 7 is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10). Yield: 5 mg (18%).

R. (Dichloromethane/acetone, 90-10): 0.67

IR (Film): ny - 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (I) = 613 (9 (M⁺)), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: C₂₉H₄₀O₉NSCl calculated: 613.2112 for [M]⁺
found: 613.2131

Example 4:

Compound 1d

10 mg (0.020 mmole) of epothilone B is dissolved in 0.5 mL of tetrahydrofuran, then 0.5 mL of 1 N hydrochloric acid is added and the mixture stirred for 30 minutes at room temperature. Then 1 M phosphate buffer at pH 7 is added and the aqueous phase is extracted 4 times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and freed from solvent. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 85:15). Yield: 1 mg (9%)

R. (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.38

MS (20/79 eV): m/e (4) = 543 (2 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: $C_{27}H_{42}O_6NSCl$ calculated: 543.2421 for $[M^+]$
found: 543.2405

Example 5:

Compound 2a

Epothilone A, 100 mg (0.203 mmole), is dissolved in 4 mL of tetrahydrofuran/1 M phosphate buffer, pH 7 (1:1) and sodium borohydride (150 mg = 3.965 mmole) is added until the thin-layer chromatogram shows that the starting material reacted completely. Then the mixture is diluted with 1 M phosphate buffer, pH 7 and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done by silica gel chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 95:5 - in 5 steps to dichloromethane/acetone, 85:15).

Yield: (20%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 75:25): 0.27

IR (Film): ν = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1}

MS (20/70 eV): m/e (%) = 495 (6) [M^+], 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 166 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27)

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{NS}$ calculated: 495.2655 for [M^+]
found: 495.2623

Example 6:

Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

Epothilone, 100 mg (0.203 mmole) is dissolved in 3 mL of pyridine, with 50 μL (0.686 mmole) of thionyl chloride added and the mixture is stirred for 15 minutes at room temperature. Then, 1 M phosphate buffer, pH 7, is added and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product and separation of the four stereoisomers 3a-d is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.50

IR (Film): ν = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 539 (40, $[M^+]$), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ calculated: 539.2011 for $[M^+]$

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.44

IR (Film): ν = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (m), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 539 (27, $[M^+]$), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 129 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$ calculated: 539.2011 for $[M^+]$
found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.38.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 539 (51, $[M^+]$), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M]⁺
found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%)

R_f (toluene/methanol, 90:10): 0.33

MS (20/70 eV): m/e (t) = 539 (62 (100)), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35)

High resolution: C₂₆H₃₇O₇NS₂ calculated: 539.2011 for [M⁺]
found: 539.1997

Example 7:

Compound 4a

Epothilone A, 10 mg (0.020 mmole), is dissolved in 2 mL of dichloromethane, cooled to -70°C and then treated with ozone for 5 minutes until a weak blue coloration develops. The resulting reaction mixture is then treated with 0.5 mL of dimethyl sulfide and heated to room temperature. In the work-up, the solvent is removed from the reaction mixture and finally the product is purified with preparative layer chromatography (solvent dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5).

Yield: 5 mg (64%)

R₁ (Dichloromethane/acetone/methanol, 85:10:5): 0.61

IR (Film): ny - 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1} .

DV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 202 (3.53) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14), 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: C₂₁H₃₄O₇ calculated: 398.2305 for [M⁺]
found: 398.2295

Example 8:

Compound 6a

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 10 mg (0.018 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloromethane, 27 μ L (0.180 mmole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred at room temperature for 60 minutes.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. After elimination of the solvent, the resulting crude product is dissolved in 1 mL of methanol, treated with 200 μ L of ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH₃/mL of methanol) and stirred overnight at room temperature. For work-up, the solvent is removed in vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

R_f (Dichloromethane/acetone, 85:15): 0.46

IR (Film): ν = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm⁻¹

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 475 (28 [M⁺]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (60), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (15), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: C₂₆H₃₇O₃NS calculated: 475.2392 for [M⁺]
found: 475.2384

Example 9:

Compound 6b

3,7-Di-O-formyl-epothilone A, 50 mg (0.091 mmole), is dissolved in 1 mL of dichloroethane, 2 mL (0.013 mole) of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) is added and the mixture stirred for 12 hours at 90°C.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M sodium dihydrogen phosphate buffer, pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent removed. The purification of the crude product, which consists of two compounds, is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: dichloromethane/acetone, 90:10).

Yield: 7 mg (15%)

Substance code

R. (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.62

IR (Film), ny - 2951 (w, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) fm 1.

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: $C_{27}H_{37}O_6NS$ calculated: 503.2342 for $[M^+]$

found: 503.2303

Example 10:**Compound 6c**

3,7-Di-O-acetyl-epothilone, 5 mg (0.009 mmole), is dissolved in 1 mL of methanol, 150 μ L of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3 /mL of methanol) is added and the mixture stirred overnight at 50°C.

For work-up, the solvent is removed in vacuum and the crude product is purified with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%) R_f (Dichloromethane/acetone, 90:10): 0.55

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 210 (4.33) nm.

MS (20/70 eV): m/e (%) = 517 (52 $[M^+]$), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

High resolution: $C_{28}H_{39}O_6NS$ calculated: 517.2498 for $[M^+]$

found: 517.2492

Example 11:**Compound 7a**

Epothilone, 20 mg (0.041 mmole), is dissolved in 0.5 mL of methanol, 0.5 mL of 1 N sodium hydroxide is added and the mixture stirred for 5 minutes at room temperature.

For work-up, the reaction mixture is treated with 1 M phosphate buffer, pH 7, and the aqueous phase is extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate and the solvent is removed. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography. (solvent: dichloromethane/methanol, 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

R_f (Dichloromethane/methanol, 85:15): 0.92

IR (Film): ν_{max} = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 eV): m/e (%) = 423 (0.1 [M⁺]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (57).

High resolution: $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{NS}$ calculated: 423.2443 for [M⁺]
found: 423.2410

Example 12:**Compound 7b**

5 mg (0.009 mmole) of 7-O-acetyl-epothilone is dissolved in 1 mL of methanol, 200 μL of an ammoniacal methanol solution (2 mmole of NH_3/mL of methanol) is added and the mixture is stirred for 2 days at 50°C. For work-up, the solvent is removed in vacuum. The purification of the crude product is done with the aid of preparative layer chromatography (solvent: toluene/methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (59%)

R_f (Dichloromethane/methanol, 90:10): 0.63

IR (Film) ny = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1}

UV (Methanol): λ_{max} (lg epsilon) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.

MS (20/70 eV): m/e (t) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

High resolution: C₂₉H₄₅O₈NS calculated: 567.2866 for [M⁺]
found: 567.2849

Example 13:

Epothilone A, 50 mg, is dissolved in 20 μ L of dimethyl sulfoxide and diluted with 30 mL of phosphate buffer (pH 7.1, 30 mM). After addition of 5 mg of pig liver esterase (Boehringer Mannheim), the mixture is stirred for 2 days at 30°C. It is acidified with 2 N HCl to pH 5 and the epothilonic acid **7** is extracted with ethyl acetate. The organic phase is dried with sodium sulfate and evaporated to dryness in vacuum. Yield 48 mg (96%).

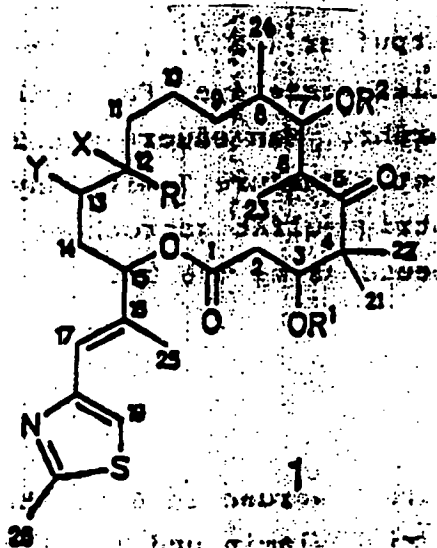
Example 14:

Epothilonic acid 7, 48 mg, is dissolved in 6 mL of absolute THF and 40 μ L of triethylamine and 16 μ L of 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride are added under stirring. After 15 minutes, the precipitate is filtered off and, within 15 minutes, under rapid stirring, it is added dropwise to a boiling solution of 20 mg of 4-dimethylaminopyridine in 200 mL of absolute toluene. After another 10 minutes, the mixture is evaporated in vacuum and the residue is partitioned between ethyl acetate/citrate buffer (pH 4). The evaporation residue of the organic phase gives 15 mg of epothilone A after preparative HPLC separation.

September 25, 1996/he

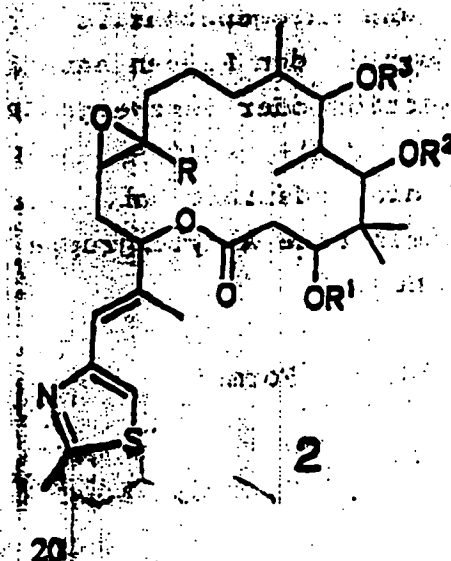
Patent Claims

1. Epothilone derivative having Formula 1



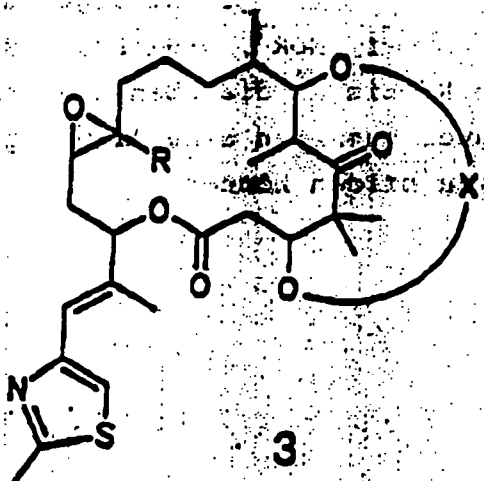
where R = H, C₁₋₄-alkyl; R¹, R² = H, C₁₋₆-alkyl, C₁₋₆-acyl, benzoyl, C₁₋₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁₋₆-alkoxy, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and the alkyl and acyl groups in these groups are straight-chain or branched groups and X and Y are either the same or different and stand for halogen, OH, O-(C₁₋₆)-acyl, O-(C₁₋₆-alkyl, O-benzoyl. [handwritten: -O-, {rest is illegible}]

2. Epothilone derivative having formula 2



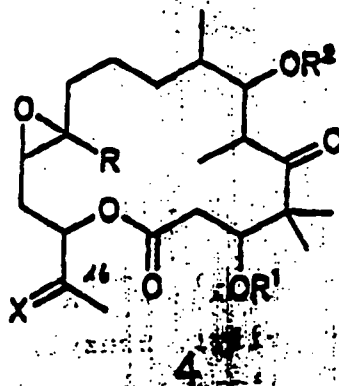
where $R = H, C_{1-4}\text{-alkyl}$; $R^1, R^2, R^3 = H, C_{1-6}\text{-alkyl}, C_{1-6}\text{-acyl}, \text{benzoyl}, C_{1-4}\text{-trialkylsilyl}, \text{benzyl}, \text{phenyl}, C_{1-6}\text{-alkoxy-}, C_6\text{-alkyl-}, \text{hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl}$; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

3. Epothilone derivative according to formula 3



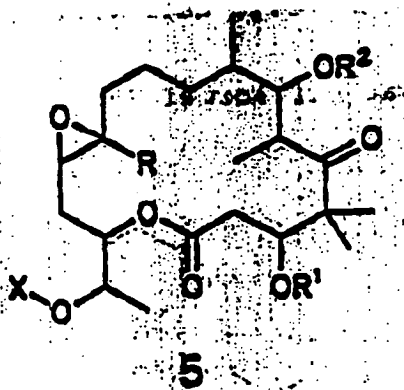
where $R = H, C_{1-4}\text{-alkyl}$; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}\text{-alkyl}, C_{1-6}\text{-acyl}, \text{benzoyl}, C_{1-4}\text{-trialkylsilyl}, \text{benzyl}, \text{phenyl}, C_{1-6}\text{-alkoxy-}, C_6\text{-alkyl-}, \text{hydroxy-}, \text{and halogen-substituted benzyl and phenyl}$; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands generally for $-C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR^1R^2-$ and $-SiR^2-$, where R, R^1 and R^2 have the meaning given above and R^1 and R^2 together can also form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms.

4. Epothilone derivative according to formula 4



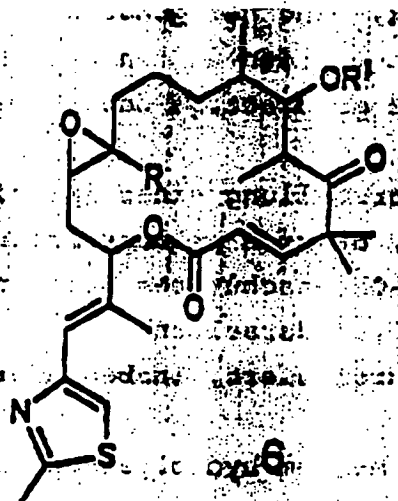
where $R = H, C_{1-4}$ -alkyl; $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 = H, C_{1-6}$ -alkyl, C_{1-6} -acyl, benzoyl, C_{1-4} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups; X stands for oxygen, NOR^3 , $N-NR^4R^5$, and $N-NHCONR^4R^5$, where the groups R^3 to R^5 have the meaning given above and R^4 and R^5 together can form an alkylene group with 2 to 6 carbon atoms;

5. Epothilone derivative having formula 5



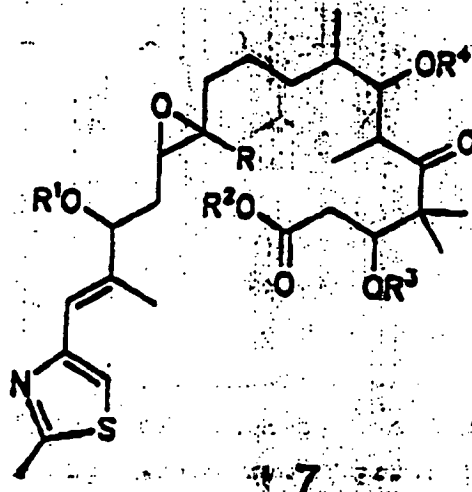
where $R = H, C_{1-4}$ -alkyl; $R^1, R^2 = H, C_{1-6}$ -alkyl, C_{1-6} -acyl, benzoyl, C_{1-4} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups and X stands for hydrogen, C_{1-18} -alkyl, C_{1-18} -acyl, benzoyl and cinnamoyl.

6. Epothilone derivative according to formula 6



in which $R = H, C_{1-4}$ -alkyl and $R^1 = H, C_{1-6}$ -alkyl, C_{1-6} -acyl, benzoyl, C_{1-4} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

7. Epothilone derivative according to formula 7



in which $R = H, C_{1-4}$ -alkyl; and $R^1, R^2, R^3, R^4 = H, C_{1-6}$ -alkyl, C_{1-6} -acyl, benzoyl, C_{1-4} -trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C_{1-6} -alkoxy-, C_6 -alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl

or phenyl; the alkyl and acyl groups contained in these groups are straight-chain or branched groups.

8. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, *characterized by the fact* that epothilone A, epothilone B, a 3-OH-protected derivative of these or a 7-OH-protected derivative of these is

- (a) hydrolyzed enzymatically, especially with an esterase or lipase, or
- (b) is hydrolyzed in an alkaline medium, especially with sodium hydroxide, in a methanol/water mixture, and the epothilone derivative having formula 7 is obtained and isolated.

9. Method for the preparation of an epothilone derivative having formula 2, according to Claim 2, *characterized by the fact* that an epothilone derivative having formula 7, according to Claim 7, or as product of the method according to Claim 8, is converted into the epothilone derivative having formula 2 according to

- (a) the Yamaguchi method or
 - (b) the Corey method or
 - (c) the Kellogg method
- and then this conversion product is isolated.

10. Means for plant protection in agriculture and forestry and/or in gardening, consisting of one or several of the compounds according to one of the previous Claims, or one or several of these compounds together with one or several usual carrier(s) and/or diluent(s).

11. Therapeutic agent, especially for use as cytostatic agent, consisting of one or several of the compounds according to one or several of Claims 1 to 7, or one or several compounds according to one or several of Claims 1 to 7 together with one or several of the usual carrier(s) and/or diluent(s).

Summary

The present invention is concerned with epothilone derivatives and with their use.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.